

suinus (auxo-autotroph), wahrscheinlich für die ganze Familie der Mucorineen, als zeitlich begrenzt wirkender Zusatzwachstumsfaktor zu betrachten ist.

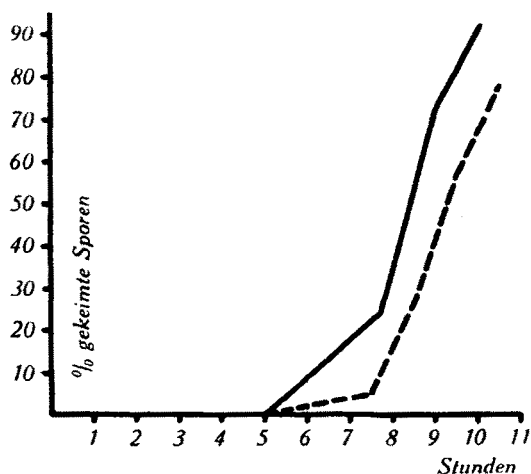


Abb. 2. Sporenkeimung von *Rhizopus nodosus*.

— mit Hypoxanthin — — ohne Hypoxanthin.

Der Firma Hoffmann-La Roche & Co., Basel, sei für die freundliche Überlassung von Hypoxanthin bestens gedankt.

HANS HURNI

Botanisches Institut der Universität Bern, den 9. Januar 1946.

Summary

In case of *Absidia coerulescens*, *Mucor mucedo*, *Rhizopus nodosus*, *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus suinus* (auxo-autotroph), Hypoxanthine effects, as well as in case of *Phycomyces Blakesleeana* (auxo-heterotroph), by acceleration of the germinating of the spores a temporary increased growth in contrary to controls without this additional growth factor.

Microméthode potentiométrique pour la détermination de la cholinestérase

L'actualité du problème de la cholinestérase a suscité l'idée de l'élaboration d'une méthode exacte, pratique et simple pour la détermination de la teneur en cholinestérase du sérum sanguin ou des tissus en se basant sur la vitesse d'hydrolyse de l'acétylcholine. La littérature (R. AMMON¹) nous renseigne sur toute une série de méthodes. Parmi celles-ci, citons celles de F. HEIM et A. FAHR; O. LOEWI et E. NAVRATIL; LINDESTROM, LANG et HOLTER; E. STEDMAN et E. STEDMAN; M. RINKEL et M. PIJOAN; RENSHAW et BACON; E. STEDMAN, E. STEDMAN et L. H. EASSON; E. STEDMAN, E. STEDMAN et A. C. WHITE; B. VAHLQUIST, G. E. HALL et C. C. LUCAS; D. GLICK; N. O. ABDON et B. UVNÄS.

La méthode de E. STEDMAN, E. STEDMAN et A. C. WHITE² qui nous a servi de base pour l'élaboration de la méthode décrite dans la précédente note, manque dans certains cas (solutions colorées) d'exactitude à cause de la mesure du pH à l'aide d'un indicateur co-

lorimétrique. Nous avons transformé cette méthode en une méthode potentiométrique générale en utilisant l'électrode d'antimoine pour la mesure du pH.

Description de la méthode:

La figure 1 donne un schéma de l'appareil utilisé. Dans un vase à double paroi de 30 cm³ de volume, on introduit 20 cm³ d'eau bidistillée et 0,2 cm³ d'une solution de chlorhydrate d'acétylcholine à 25 %. Un petit agitateur remue la solution d'une manière constante, tandis que le même moteur fait fonctionner une petite pompe qui renouvelle l'eau tiède (30° C) dans le capuchon extérieur du vase. Un thermorégulateur décrit par un de nous³, une chauffeuse et un thermomètre électrique assurent la constance de la température de l'eau.

La partie inférieure du vase est munie de part et d'autre d'une ouverture. Celles-ci laissent passer les électrodes d'antimoine et de calomel (l'électrode de calomel est indirectement mise en contact avec la solution à l'aide d'une pierre ponce). Les deux électrodes sont reliées à un potentiomètre. Celui-ci permet de suivre le pH de la solution à examiner. En effet, suivant

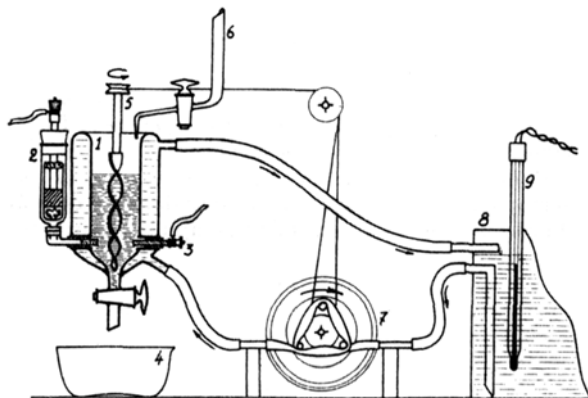


Fig. 1. Schéma de l'appareil pour la détermination de la cholinestérase.

- 1 Vase de réaction à double parois.
- 2 Electrode de calomel.
- 3 Electrode d'antimoine.
- 4 Récipient.
- 5 Agitateur.
- 6 Micro-burette graduée au 1/100 cm³.
- 7 Moteur synchrone faisant \pm 100 tours à la minute activant la pompe de l'eau tiède et l'agitateur.
- 8 Réservoir d'environ 4 litres contenant l'eau tiède.
- 9 Thermomètre à contact relié au thermorégulateur et à la chauffeuse pour maintenir la température de l'eau à 30° C.

les constatations et calculs de KOLTHOFF et HARTONG², on retrouve comme potentiel entre l'électrode d'antimoine et l'électrode de calomel normal en milieu alcalin un potentiel de:

$$E = 0,0009 + 0,0536 \text{ pH } (14^{\circ} \text{ C})$$

pour un pH:8 auquel E. STEDMAN, E. STEDMAN et A. C. WHITE travaillent, on trouve:

$$E = 0,0009 + 0,0536 \cdot 8 = 0,4297 \text{ V}$$

Ce chiffre est légèrement modifié à 30° C, suite à la variation de la température (la formule étant élaborée à 14° C) et suite à un potentiel de contact qui se manifeste

¹ R. AMMON, *Ergebn. der Enzymforsch.* 9, 35 (1943); *Pflügers Arch.* 233, 486 (1935).

² E. STEDMAN, E. STEDMAN et A. C. WHITE, *Biochem. J.* 27, 1056 (1933).

³ A. L. DELAUNOIS, *Proc. physiol. Soc., J. Physiol.* 96, (1939).

² KOLTHOFF et HARTONG, *Rev. trav. chim. Pays-Bas*, 1925, 113.

entre l'électrode de calomel et le fil conducteur qui est en cuivre. Avant chaque série de déterminations, on introduit dans le vase, un tampon au borate de pH 8 et on détermine au potentiomètre la tension électrique qui se produit entre l'électrode de calomel et l'électrode d'antimoine. Connaissant cette tension, on vide le vase et on y introduit 20 cm³ d'eau bidistillée et 0,2 cm³ d'une solution d'acétylcholine à 25 %. La tension électrique qu'on mesure à ce moment n'est plus la même qu'avec le tampon, puisque le pH est modifié par suite de l'hydrolyse spontanée de l'acétylcholine. En ramenant le pH à la valeur initiale 8 au moyen d'une solution de soude caustique 0,01 N, on parvient à rétablir l'état d'équilibre entre la tension trouvée avec le tampon et la tension produite dans la solution à examiner. A ce moment le galvanomètre indique 0, on met un chronomètre en marche et on ajoute un léger excès de soude caustique ($\pm 0,06$ cm³); on attend que le galvanomètre revienne à 0, on note le temps et la quantité de soude caustique ajoutée et on réajoute une faible quantité de soude caustique; après ± 2 minutes, lorsque le galvanomètre est à 0, on note à nouveau le temps et la quantité de soude caustique ajoutée. La détermination se poursuit ainsi pendant 15 à 20 minutes. Les quantités de soude caustique employées et le temps noté pendant l'hydrolyse spontanée de l'acétylcholine nous permettent de dresser une courbe.

La figure 2 nous montre une courbe qui permet de mettre en valeur la précision avec laquelle les différents points peuvent être déterminés.

Connaissant la quantité de soude caustique nécessaire pour l'essai à blanc, on introduit dans le vase 0,2 cm³ du sérum sanguin à examiner. On ajoute environ toutes

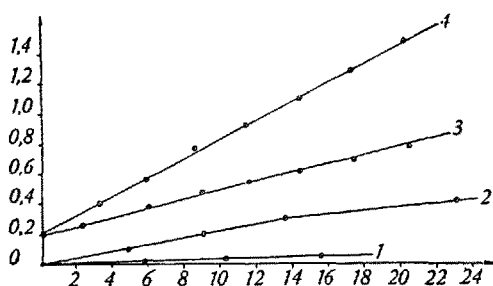


Fig. 2. Courbes d'hydrolyse de l'acétylcholine.

En abscisses: temps en minutes.

En ordonnées: cm³ NaOH N/100.

1 Hydrolyse spontanée de l'acétylcholine à 3 mg %.

2 Hydrolyse de l'acétylcholine à 3 mg % en présence de globules sanguins.

3 Hydrolyse spontanée de l'acétylcholine à 25 mg %.

4 Hydrolyse de l'acétylcholine à 25 mg % en présence de sérum sanguin.

les 2 à 3 minutes $\pm 0,14$ cm³ de soude caustique, on note le temps exact où le galvanomètre revient au 0 (pH 8). En retranchant la valeur trouvée pour l'hydrolyse de l'acétylcholine lors de l'essai à blanc, de la valeur obtenue en présence du sérum sanguin, on trouve d'une façon exacte et précise la valeur de la cholinestérase en appliquant le calcul de E. STEDMAN, E. STEDMAN et A. C. WHITE. La valeur de la cholinestérase est exprimée en cm³ de soude caustique N/200 nécessaires pour neutraliser l'acide acétique formé pendant 20 minutes par l'hydrolyse de l'acétylcholine en présence de 1 cm³ de sérum.

Ci-dessous nous donnons un exemple:

Protocole de l'expérience III (20 septembre 1945) (fig. 2):

Température 30° C; pH 8; mV = 407; titre NaOH: 0,0097 N.

Valeur de l'hydrolyse spontanée de l'acétylcholine exprimée en cm ³ NaOH correspondant à un temps déterminé		Valeur de l'hydrolyse de l'acétylcholine en présence du sérum sanguin exprimée en cm ³ NaOH correspondant à un temps déterminé	
cm ³ de NaOH	Temps	cm ³ de NaOH	Temps
0,19	= 0	0,40	= 3'20''
0,26	= 2'20''	0,56	= 5'55''
0,38	= 6'	0,77	= 8'35''
0,47	= 9'	0,92	= 11'25''
0,54	= 11'35''	1,10	= 14'25''
0,61	= 14'25''	1,28	= 17'15''
0,69	= 17'25''	1,47	= 20'10''
0,78	= 20'30''	1,60	= 22'40''

Pour l'hydrolyse spontanée de l'acétylcholine en 20 minutes nous trouvons la valeur de A = exprimée en cm³ NaOH. 0,02 N pour 1 cm³ de la solution de l'acétylcholine, de la façon suivante:

$$A = \frac{\text{cm}^3 \text{ NaOH} \cdot 20' \cdot \frac{0,0097 \cdot 5}{0,02}}{20'30'' \text{ (temps de la détermination)}}.$$

$$A = \frac{0,59 \cdot 40 \cdot 0,485 \cdot 5}{41} = 1,395.$$

De même pour B = valeur de l'hydrolyse de l'acétylcholine en présence du sérum, nous trouvons:

$$B = \frac{1,20 \cdot 60 \cdot 0,485 \cdot 5}{58} = 3,725.$$

En retranchant la valeur A de B , nous trouvons:

$$3,725 - 1,395 = 2,33.$$

Quant on compare nos valeurs trouvées pour l'hydrolyse spontanée de l'acétylcholine avec celles trouvées par E. STEDMAN, E. STEDMAN et A. C. WHITE, on constate une sensible différence. Cette différence doit être imputée au fait que nous travaillons toujours en milieu légèrement alcalin, ce qui favorise l'hydrolyse de l'acétylcholine. En effet, nous introduisons toujours un léger excès de soude caustique et nous déterminons le temps nécessaire pour le retour au pH 8, tandis que les auteurs précités font la détermination en milieu acide et ne ramènent que toutes les 5 minutes la solution au pH 8. La méthode que nous avons adoptée rend la méthode potentiométrique beaucoup plus pratique. Elle n'influence en rien l'action de la cholinestérase du sang, puisque, suivant les données de D. GLICK, cette dernière n'est que très peu influencée par les variations du pH autour de la valeur optimale pour l'hydrolyse (pH 8) de l'acétylcholine.

Les déterminations de contrôle que nous avons effectuées en utilisant les deux méthodes, celle de E. STEDMAN, E. STEDMAN et A. C. WHITE et celle décrite par nous, montrent clairement que la valeur de la cholinestérase du sérum sanguin chez le chien est la même dans les deux cas.

Cholinestérase du sérum sanguin en milieu acide	Cholinestérase du sérum sanguin en milieu basique
cm ³ NaOH N/200	cm ³ NaOH N/200
1 ^o 1,453	1 ^o 1,37
2 ^o 1,19	2 ^o 1,25
3 ^o 1,74	3 ^o 1,67

Sensibilité de la méthode:

Nous avons fait plusieurs essais en double, soit essais à blanc, soit dosages de la cholinestérase du sérum sanguin et avons pu constater que les résultats ne diffèrent jamais de plus de 5%.

Valeurs de l'hydrolyse de l'acétylcholine exprimées en cm³ NaOH N/200

Solutions aqueuses d'acétylcholine (0,2 cm ³ à 25%)	1,32	1,33
	1,32	1,21
	1,46	1,091
	1,395	1,091

Valeurs de l'hydrolyse de l'acétylcholine exprimées en cm³ NaOH N/200

En présence de sérum sanguin (0,2 cm ³)	2,209	2,17
	2,33	2,2
	1,797	
	1,806	

Comme le galvanomètre accuse des déviations encore appréciables à des concentrations d'acétylcholine de 3 à 4 mg %, nous avons pu suivre aisément l'hydrolyse spontanée de l'acétylcholine à cette concentration en diluant la soude caustique à la concentration de N/500. Ceci nous a permis d'étendre la méthode au dosage de la cholinestérase des globules sanguins. En effet, B. MENDEL et H. RUDNEY¹, ainsi que B. MENDEL, D. MUNDELL et H. RUDNEY² ont pu mettre en évidence que l'activité de la cholinestérase des globules sanguins est maximale à la concentration de 3 mg % d'acétylcholine.

La figure 2 nous donne deux courbes:

1^o de l'hydrolyse spontanée de l'acétylcholine à cette faible concentration;

2^o de l'hydrolyse de l'acétylcholine en présence des globules sanguins (0,2 cm³).

Nous communiquerons dans un travail détaillé les résultats de nos observations concernant la cholinestérase du sérum sanguin, des globules sanguins et des tissus.

A. L. DELAUNOIS et H. CASIER

Institut J. F. Heymans de Pharmacodynamie de l'Université de Gand, le 15 janvier 1946.

Summary

A simple very sensitive and usefull method is described for the potentiometric micro-determination of the cholinesterase of blood serum, globules and tissues, using an ordinary potentiometer and an antimony electrode. This method makes it possible to determine the cholinesterase in solutions of acetylcholine down to 3 mg %.

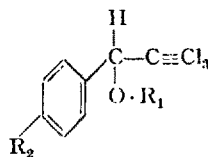
¹ B. MENDEL et H. RUDNEY, Biochem. J. 37, 59 (1943).

² B. MENDEL, D. MUNDELL et H. RUDNEY, Biochem. J. 37, 473 (1943).

Substanzen mit askarizider Wirkung

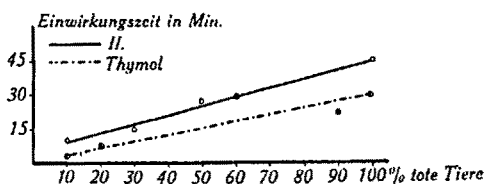
Natürliche Insektizide wurden schon verschiedentlich, zum Teil mit Erfolg, als Anthelmintika versucht¹⁻³. Es schien uns deshalb interessant, auch das DDT auf seine anthelmintischen Eigenschaften zu prüfen, insbesondere da dieser Stoff für den Warmblüter weitgehend ungiftig ist^{4,5}. Bei der Testierung der Substanz in 10/100-Suspension in Bunge-Lösung⁶ an Schweineaskariden (*Ascaris lumbricoides*) nach LAMSON⁷ und Mitarbeiter oder am Regenwurm nach JENKINS⁸ oder STRAUB⁹ überlebten die Würmer aber eine Einwirkungszeit von 7 Stunden ohne irgendwelche Schädigung.

Nach diesem negativen Resultat wandten wir uns dem Stoff I zu, der unter dem DRP. 673246 als Insektizid eingeführt wurde. Bei der Prüfung stirbt der Regenwurm in einer Konzentration von 1:5000 nach 2—3 Minuten unter heftigsten Zuckungen. Ebenso wirksam erwies sich das Benzolderivat II und die Tolylderivat III. Auch an Askariden erwiesen sich die drei Verbindungen als gut wirksam.



- I: R₁=H; R₂=Cl
 II: R₁=H; R₂=H
 III: R₁=H; R₂=-CH₃
 IV: R₁=-COCH₂CH₂CO₂H; R₂=-Cl
 V: R₁=-COCH₂CH₂CO₂H; R₂=-H
 VI: R₁=-COCH₂CH₂CO₂H; R₂=-CH₃

Wie aus der untenstehenden graphischen Darstellung ersichtlich ist, erreicht die Wirkungsstärke der Substanz II an Askariden diejenige des Thymols. (Die Substanzen I und III geben mit sehr geringen Abweichungen die gleichen Kurven wie II.) Dabei ist noch zu beachten, daß die Wasserlöslichkeit von I, II und III viel geringer ist als die von Thymol, das somit besser zur Wirkung gelangen kann.



Zur Prüfung an Askariden verwendeten wir eine 10/100-Suspension, die für Regenwürmer innerhalb einer halben Minute tödlich wirkt; in Übereinstimmung mit LAMSON¹⁰ konnten auch wir feststellen, daß Regen-

¹ M. ANGLADE, O. GAUDIN, R. ARCONY, Bl. des Sci. pharmacol. 39, 23 (1932).

² E. PERROT, Bl. des Sci. pharmacol. 39, 42 (1932).

³ A. JORES, H. WOLTER, Klin. Wschr. 18, 885 (1939).

⁴ P. LAUGER, R. PULVER, C. MONTIGEL, Helv. physiol. acta 3, 405 (1945).

⁵ G. R. CAMERON, F. BURGESS, Brit. med. J. 1945, I, 865; Chem. Abstr. 39, 4682 (1945).

⁶ G. BUNGE, Z. physiol. Chemie 8, 51 (1883).

⁷ P. D. LAMSON, H. W. BRAUN, Amer. J. Hygiene 23, 85 (1936).

⁸ G. L. JENKINS, L. LAVAN MANCHEY, J. Amer. Pharmaceut. Assoc. 25, 194 (1936).

⁹ W. STRAUB, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. 48, 1 (1902).

¹⁰ P. D. LAMSON, C. B. WARD, Science 84, 293 (1936).